

MENU SEARCH INDEX DETAIL JAPANESE

1 / 1

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-121865

(43)Date of publication of application : 13.05.1997

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
C07H 21/04  
C07K 14/705  
C12N 1/21  
C12P 21/02  
G01N 33/566  
// A61K 38/00  
A61K 39/395  
A61K 48/00  
C12Q 1/68  
(C12N 1/21  
C12R 1:19 )

(21)Application number : 07-303301

(71)Applicant : TAKEDA CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 30.10.1995

(72)Inventor : HINUMA KUNIIJI  
FUKUZUMI MASASHI  
ITO YASUAKI  
FUJII AKIRA

## (54) NEW G-PROTEIN-COUPLED TYPE RECEPTOR PROTEIN, ITS PRODUCTION AND USE THEREOF

### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To produce the subject protein derived from a human brain and human lungs and useful for development, etc., of medicines containing a receptor agonist or antagonist.

**SOLUTION:** This guanine nucleotide-binding protein (G-protein)-coupled type receptor protein derived from a human brain and human lungs or its salt or further a partial peptide of the G-protein coupled type receptor protein or its salt comprises the same or the substantially same amino acid sequence as that of formula I or II. The G-protein coupled type receptor protein is obtained from a tissue of a warm-blooded animal or its cell according to a well-known method for purification.

Ala Ile Ala Arg His Leu Thr Ser Leu Val Leu Thr Asp Lys Ile  
1 5 10 15  
Ser Thr Asp Thr Arg Glu Thr Thr Glu Glu Asp Met Cys Leu Leu  
20 25 30

Val Val Ala Leu Thr Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser  
35 40 45 50 55 60 65 70 75 80  
Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr  
85 90 95 100 105 110 115 120 125 130

Ala Val Ala Asp Gly Leu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr  
135 140 145 150 155 160 165 170 175 180  
Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr  
185 190 195 200 205 210 215 220 225 230

Ser Val Val Ala Leu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr  
235 240 245 250 255 260 265 270 275 280  
Ser Met Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr  
285 290 295 300 305 310 315 320 325 330

I

II

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

Best Available Copy

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

特開平9-121865

(43)公開日 平成9年(1997)5月13日

(51)IntCl.	識別記号	片内整理番号	FI	技術表示箇所
C12N 15/09	ZNA	9162-4B	C12N 15/00	ZNAA
C07H 21/04			C07H 21/04	B
C07K 14/705			C07K 14/705	
C12N 1/21			C12N 1/21	
C12P 21/02			C12P 21/02	C

審査請求 未請求 請求項の数13 FD (全 34 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平7-303301	(71)出願人	000002934 武田薬品工業株式会社
(22)出願日	平成7年(1995)10月30日	(72)発明者	日 沼 州 司 大坂府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 茨城つくくば市春日1丁目7番地の9 武 田春日ハイヅ1402号 (72)発明者 稲 住 昌 司 茨城県つくくば市並木3丁目17番地の6 ロ イナルシティ並木302号 (72)発明者 伊 藤 康 明 茨城県土浦市後ヶ丘町38番地の18 (74)代理人 弁 理 士 水 野 昭 雄

(54)【発明の名称】 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その製造法および用途

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その製造法および用途の提供。

【解決手段】 ヒト由来及びヒト肺由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチド、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、リガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法またはスクリーニング用キット、該スクリーニング方法またはスクリーニング用キットで得られる化合物またはその塩、該化合物またはその塩を含有する医薬組成物、該蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：1または配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩。

【請求項2】 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有する。

【請求項3】 配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列を有する請求項2記載のDNA。

【請求項4】 請求項2または3記載のDNAを含有することを特徴とするベクター。

【請求項5】 請求項4記載のベクターを保持する形質転換体。

【請求項6】 請求項5記載の形質転換体を培養し、形質転換体にG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを生成せしめることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩の製造方法。

【請求項7】 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩と、試験試料とを接触させることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩に対するリガンドの決定方法。

【請求項8】 (1)請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドを接触させた場合と(11)請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項9】 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩を含有することを特徴とする、リガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項10】 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体。

【請求項11】 請求項8記載のスクリーニング方法または請求項9記載のスクリーニング用キットを用いて得られるG蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニスト。

【請求項12】 請求項2記載のDNAをプライマーあるいはプロンプとして用いてクロニングされたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

【請求項13】 請求項2記載のDNAをプライマーあるいはプロンプとして用いてクロニングされたDNAによりコードされたG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩あるいは該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ヒト脳及びヒト肺由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩の製造方法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (またはその部分ペプチド) およびそのDNAの用途、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいはその発現細胞を用いるリガンドの決定方法、および該G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいはその発現細胞を用いることを特徴とするリガンドとの結合性を変化せしめる性状を有するレセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、該スクリーニングのためのキット、該スクリーニング方法で得られたアゴニストまたはアンタゴニスト、さらに該アゴニストまたはアンタゴニストを含有する医薬品に関する。

【0002】

【従来の技術】 多くのホルモンや神経伝達物質は細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質の多くは共役している guanine nucleotide-binding protein (以下、G蛋白質と略称する場合がある) の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは7個膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは7個膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら生体の細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生体活性物質等の調節として非常に重要な役割を担っている。

【0003】 各種生体の細胞や臓器の内の伝達機能は調節する物質と、その特異的なレセプター、時にはそれらで発現する特異的なG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。例えば、脳などの中枢神経系の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生体活性物質などによ

の調節のもとで肺の生理的な機能の調節が行われている。特に神経伝達物質は脳内の様々な部位に存在し、それに対して対応するレセプターを通じてその生理機能の調節を行っている。脳内には未だ未知の神経伝達物も多く、そのレセプター蛋白質・CDNAの構造に関しても、これまで報告されていないものも多いと考えられる。さらに、既知のレセプター蛋白質のサブタイプが存在するかどうかについても分かっていなかった。さらにまた肺など呼吸器系の器官でも、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質などによる調節のもとで呼吸器系の生理的な機能の調節が行われている。特に肺では、可呼吸性の生理活性物質がいくつ也存在し、血圧、血圧、呼吸運動のそれぞれに対して対応するレセプターを通じてその調節機能を果たしている。また、肺では未知の生理活性物質なども多く存在すると思われる。当然そのレセプター遺伝子やCDNAの構造に関しても、これまで報告されていないものも多いと考えられる。さらに、既知のレセプター蛋白質のサブタイプが存在することと考えられる。

1000041 種における複雑な機能を調節する物質と、その特異的なレシタターとの関係を明らかにすることは、呼吸器疾患の発症に非常に重要な手段である。また、レシタター-蛋白質に対するアジュニスト、アジュニストを効果よくスクリーニングし、医療系を開発するためには、国内で発見しているレシタター-蛋白質の遺伝子の機能を説明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要である。さらに肺などの呼吸器系における複雑な機能を調節する物質と、それらは医療系開系に非常に重要な手段とすること、これは医療系開系に非常に重要な手段である。特に肺などの呼吸器系の機能を調節するためのレシタター-蛋白質に対するアジュニスト、アジュニストを効果よくスクリーニングし、医療系を開発するために、肺で発見しているレシタター-蛋白質の遺伝子の機能を説明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

**[0005]**

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ヒト胚由来おびヒト胎由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、膜蛋白質をコードするDNAを含有するDNA、膜蛋白質の製造方法および核蛋白質およびDNAの用途等を提供するものである。本発明は、新規膜蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩、膜G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA、該DNAを含有するペプチド、膜ペプチドで形成された塩、核質膜熱体から得られた細胞膜成分、膜G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩の製造方法、膜G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその発現細胞（核質膜熱体を含む）を用いるG蛋白質共役型レセプター

ターに対するリガンドの測定方法。該G蛋白質共役型シグナルペプチドまたはその複製断片を用いるG蛋白質共役型シグナルペプチドまたはその複製断片のスクリーニング方法、該スクリーニング用シグナルペプチド、該スクリーニングにより得られたアミノ酸またはペプチド、該G蛋白質共役型シグナルペプチドまたはその複製断片を含有する医薬、該G蛋白質共役型シグナルペプチドまたはその複製断片を用いた免疫診断剤、該G蛋白質共役型シグナルペプチドまたはその複製断片を用いた免疫治療剤、該G蛋白質共役型シグナルペプチドまたはその複製断片を用いたDNAの相変などを提供するためのものである。

**[9006]**

【課題を解決するための手段】近年、cDNA質共役型シ  
セプター-蛋白質が、その構造の一部にアミノ酸配列の相  
似性を示すことが用いて、ポリメララーゼ・チェーン・リ  
アクション (Polymerase Chain Reaction: 以下、P  
CR と略称する) 法によって新規シセプター-蛋白質発  
見を察する方法が行われるようになった。本発明者らは、  
蛋白質共役型シセプター-蛋白質をコードするDNAをよ  
り、該ポリマーに基座するもの合成DNAライブラリーを合  
成し、該ライブラリーを用いてcDNA由来のcDNAおよび  
cDNA由来のcDNAを増幅し、その解析を進めた。

の結果、本発明者は、新規のG蛋白質共役型レセプターの蛋白質をコードするcDNAを単離し、その部分的な構造を決定すること成功した。これらのG蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNAは、既知のG蛋白質共役型レセプター、DNAおよびGMPシグナルの相同性が見られ、さらにトド機能発現している新規の蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードしていると考えられる。本発明者によられるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をトド細胞およびトド前より単離したところ、これらのG蛋白質共役型レセプター蛋白質はそれぞれトドの脳内およびトドの前において発現し、何らかの働きを持っていることが示唆される。このことから、これらのレセプター蛋白質は、それぞれトドの脳内およびトドの前で発現し、機能していると考えられる。このDNAを用いれば、完全長の開放型を持つcDNAを入手することができ、該レセプター蛋白質を製造することもできる。また該cDNAをプライマーとして用いるのはフローとして用いると相補的細胞からトド由来のcDNAをクローニングすることもできる。さらに、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを適当な手段で結合させた該レセプター蛋白質を用いれば、レセプター結合実験には細胞内セカンドメッセンジャーの測定等を指標に、生体内あるいは天然・非天然の化合物などから該レセプター蛋白質に対するリガンドスクリーニングすることができ、さらには、リガンドレセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物、例えば、リガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害する化合物、あるいはリガンドとレセプター蛋白質との結合を促進する化合物

などのスクリーニングを行なうこともできることを見いだした。

【0000】より具体的には、本発明者らは、ヒト細胞由来の様々なcDNA断片として、図1に示すものをPCR法によって増幅し、サファクロニソリド、そうして得られた配列の解析から、該cDNAが新規にセプター蛋白をコードしていることが明らかになった。この配列を「ミノ酸配列」(配列番号: 1) に細く7つ区画(図1)、第2、第3、第4、第5、第6及び第7区画と、増幅されたcDNAのサイズも、既知のc蛋白質共役型ヒセプター蛋白質と比較して同程度の約700bpであった。本発明者らは、このDNAの塩基配列を細型としてデータベース検索を行ったところ、公知のc蛋白質共役型ヒセプター蛋白質あるとヒトの「ヒトスチンレセプター-サファイド」(P30872)、ヒトの「ヒトスチンレセプター-サファイド2」(P30874)およびヒトの「ヒトスチンレセプター-サファイド3」(P32745)とそれぞれ「ミノ酸配列」で6%、3.7%の( ) 内の数値は、NMR-P/Sis-PIOTにデータとして登録される際の配列番号であり、通称accession numberと呼ばれるものである。

【0008】さらに、本発明者らは、ヒト肺由来の新規なcDNA断片として(図4)に示すものをPCR法によって増幅し、サブクローニングし、その配列の解析から、該cDNAが新規にヒトタータン質をコードしていることが明らかにされた。この配列をアミノ酸配列(配列番号:2)に翻訳したところ(図4)、第2、第3、第4、第5、第6及び第7置換位置で疎水性残基プロット上で認識された(図5)。また、増幅されたcDNAのサイズも、既知のヒトタータン質と同一蛋白質と比較して同程度の約700bpであった。本発明者らは、このcDNAの塩基配列を断片としてデータベース検索を行ったところ、公開の蛋白質配列と「タータン質」であるヒトの「タータンタンセル」タータン質(2)(P30874)、ヒトの「タータンセル」タータン質(2)(P30874)、ヒトの「タータンセル」タータン質(2)(P30874)、ヒトの「タータンセル」タータン質(2)(P30874)およびヒトの「タータンセル」タータン質(2)(P30874)と一致する。上記の( )内の略語「タータンセル」は、MORF-PRINCE-PRINCE にデータとして登録されている。この登録番号より、通称Accession Numberと呼ばれるものである。

【0009】すなわち、本発明は、(1) 配列番号：1 または配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むことを特徴とするα蛋白質免疫シテプター蛋白質またはその塩あるいはα蛋白質免疫シテプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、(2) 第(1)項記載のα蛋白質免疫

型シレブタン-蛋白質またはその部分ベンチナドをコードする塩基配列を有するDNAを有するDNA、(3)配列番号3または配列番号4に与えられた塩基配列を有する第(2)項記載のDNA、(4)第(2)または(3)項記載のDNAを含むことを特徴とするベンチナド、(5)第(4)項記載のベンチナドを保持する形質転染株、(6)第(5)項記載の形質転染株を増殖し、 $\gamma$ -蛋白変異型シレブタン-蛋白質またはその部分ベンチナドを生成とめることを特徴とする第(1)項記載の $\gamma$ -蛋白変異型シレブタン-蛋白質もしくはその塩またはその部分ベンチナドもしくはその塩の製造方法、(7)第(1)項記載の $\gamma$ -蛋白変異型シレブタン-蛋白質もしくはその塩またはその部分ベンチナドもしくはその塩と、試験材料とを接触させることを特徴とする第(1)項記載の $\gamma$ -蛋白変異型シレブタン-蛋白質もしくはその塩またはその部分ベンチナドもしくはその塩に対するリファインド方法。

**[0010]** (8) (1) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター一面質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドおよび結合化合物を接触させた場合と比較を行なうことを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩との結合力を変化させる方法。

(9) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩を含むことを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩との結合力を変化する試料。(11) 第(8)項記載のスクリーニング方法は第(9)項記載のスクリーニング用

アミノ酸の配列は、その蛋白質の構造と機能を決定する重要な因子である。したがって、蛋白質の構造と機能を理解するためには、その配列を決定することが必要である。本報告では、*Escherichia coli* の 70S リボソームの 23S rRNA の配列を決定した。この配列は、他の生物の 23S rRNA の配列と比較して、非常に高い同源性を示している。これは、23S rRNA が、リボソームの構造と機能に重要な役割を果たしていることを示している。また、この配列は、リボソームの進化に関する重要な情報を提供している。本報告の結果は、リボソームの構造と機能の理解に貢献している。



骨芽細胞、破骨細胞、星状細胞、メラニン細胞、各種の  
 感知細胞、上記と上の組織由来の細胞などであることを特  
 徴とする上記第(37)項記載のDNAをスクリーニン  
 グする方法を提供する。

(0016) さらに、本発明は(39)上記載(2)項に記載のDNAにペプチダイズすることによって一部を特徴とする第(2)項記載のDNAの少なくとも一部は相補的な塩基配列を有するものと特徴とするアチナツスDNAおよびRNA、(40)第(1)項記載の蛋白質共役型シセグマ-蛋白もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩に対するモノクローナル抗体、(41)項記載のG蛋白質共役型シセグマ-蛋白もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩に対するモノクローナル抗体、(42)第(1)項記載の抗体と抗原-抗体複合物を形成せしめるための第(41)項記載の抗体と反応する試料とを特徴とする第(41)項記載の抗体と反応する試料とを形成せしめる工程-ジョイント、抗原-抗体複合物を形成せしめ

(1) 上記第(1)工程で形成された抗原・抗体複合物を抽出することと特徴とする。ここで免疫シテア蛋白質またはその部分ペプチドの検出のための免疫-定クエーティ法、(4.3)(1)上記第(1)項記載の蛋白質類似型シテア蛋白質もしくはその骨格またはの部分ペプチドもしくはその塩と測定すべき骨格または部分ペプチドとし、抗原・抗体複合物を形成し、シキユベントソフシ、抗原・抗体を形成した。(1.1)上記第(1)工程で形成された抗原・抗体複合物を抽出することと特徴とする。ここで免疫シテア蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体の検出のための免疫測定クエーティ法、(4.4)変換として行われる相対中にあることと特徴とする。上記第(3.8)イ項のラヂオシテアDNAおよびRNA、(4.5)2

にもしくはその場で個体を発現し、(11) 誘致された細胞から得られた細胞を永代培養可能な状態に保ち、(12) 蛋白質共役型シテラ-蛋白質と反応する抗体を産生する永代培養可能な細胞を選択し、そして(13) 該抗体が可能な細胞を生育せしめることを特徴とする第(1)項記載の蛋白質共役型シテラ-蛋白質をもしくはその塩またはその部分ペプチドをもしくはその塩を生ずるモノクローナル抗体を産生するハイブリドマの生産方法を要する。

**【0017】**

【説明の要領の形骸】 本明細書において、「實質的に同一」とは蛋白質の活性、例えば、リザンとの結合活性、生理的な特性などが、實質的に同じであることを意味する。アミノ酸の鹽酸、欠失あるいは挿入はしばしばアミノ酸の生理的な特性または化学的な特性に大きな変化を生ぜしめないので、こうした場合その鹽酸、欠失あるいは挿入を齎されたポリペプチドは、そうした鹽酸、欠失あるいは挿入のされていないものと實質的に同一であるといわれるであろう。該アミノ酸は列中のアミノ酸の實質的に同一な置換物としては、そのアミノ酸が属するところのクラスのうち他のアミノ酸類から選ぶことができない。非酸性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、イソバロイシン、バリン、アロギン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられる。酸性（中性）アミノ酸としては、グリシン、セリン、スロセリン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挙げられる。側鎖をもつ（塩基性）アミノ酸としては、アルギニン、リジン、ヒスチンなどが挙げられる。負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げら

る。  
[0018] 本発明のγ蛋白質役型シレブタン蛋白としては、温血動物（例えば、モルモット、ラット、ウサギ、ヒツジ、マウス、ウエ、ラザビー、ネズミ、サル、ヒトなど）のあらゆる組織（例えば、下咽頭、肺、脾臓、脳、胃腸、肝臓、生卵腺、甲状腺、胆の体、骨髄、膵臓、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓、腎臓、膵臓、骨髄、脾臓、肝臓、生卵腺、甲状腺、胆の体）または細胞などとに由来するγ蛋白質役型シレブタン蛋白であって、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列または配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と、同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有するものであれば何なるものであってもよい。すなわち、発明のγ蛋白質役型シレブタン蛋白としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質；配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質などの他に、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約90～99.9%の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、配列番号：1を含有する蛋白質と、配列番号：2を含有する蛋白質と、配列番号：1を含有する蛋白質と、配列番号：2を含有する蛋白質との間の相同性を有するアミノ酸配列と約90～99.9%の相同性を有するアミノ酸配列と。

ノ配列を含有し、配列番号・2を含有する蛋白と実質的に同質の活性を有する蛋白とが挙げられる。実質的に同質の活性としては、例えばリガンド結合能、シリアル情報伝達などが挙げられる。実質的に同質とは、リガンド結合活性などが性質的に異なることを示す。したがって、リガンド結合能の強さなどの強弱、シセター蛋白の分子量などの量的要素は異なっているといよい。

るいは糖鎖が結合したいやゆる糖蛋白質などの場合蛋白質などが含まれる。さらにまた、本発明のG蛋白質共役型シセター蛋白質には、本発明の配列番号1あるいは2の配列番号2のコード配列と同一または実質的に同一のA1、A2配列を有する増強配列を含有するDNAをライブラリーあるいはライブラリーと用いてクローニングされたDNAによりコードされたG蛋白質共役型シセター蛋白質またはその塩あるいは該G蛋白質共役型蛋白質の塩の塩酸塩またはその塩である塩である。

10 しも理解されよう。さらに具体的にたは本邦での配列番号 3 あるいは 4 の DNA 自体あるいはその部分配列またはその情報に基づいた DNA をライナーあるいはプロベとして用いてクローニングされた DNA によりコードされた C 蛋白質共役型シグナル蛋白質 A にはその塩基あるいは C 蛋白質共役型シグナル蛋白質またはその塩基あるいは C 蛋白質共役型シグナル蛋白質の部分ベクターまたはその塩であつても理解されよう。

されよう。

[illegible]

ドとしては、例えば、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位が用いられる。具体的には、(図2)あるいは(図4)で示される本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の加水性プロリンが精析において細胞外領域(加水性領域(hydrophilic)部位)であると分析された部分(加水性領域)である。また、疎水性(hydrophobic)部位(一部)を含むベンチドと同様に用いることができる。このベンチドを個別に含むベンチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のベンチドでもよい。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ベンチドとしては、とりわけ生理活性に寄与される残付増加(増大)ましい。この増大増としては、例えば無機酸(例えば塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば酢酸、乳酸、フロヒン酸、アミノ酸、アルコール酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ペンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。



【0021】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。さらに、該部分ペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を増殖することによっても製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残基部分とを結合させ、生物物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の結合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

- ①M. BodanszkyおよびM.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis)、Interscience Publisher s、New York (1966年)
- ②Schroeder およびLucibbe、ザ・ペプチド(The Peptide)、Academic Press、New York (1965年)
- ③泉原啓夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株)(1975年)

④矢島治明および神原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、緑原酸類の閉経第1巻ペプチド合成、川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、塩析・溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・電気泳動法・再結晶などを組み合わせて本発明のタンパク質を精製し得ることができ。上記方法で得られる蛋白質が選別体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって選別体に変換することができ。

【0022】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、本発明の配列番号：1のAミノ酸配列と同一または実質的に同一のAミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を含有するもの、あるいは配列番号：2のAミノ酸配列と同一または実質的に同一のAミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであってもよい。また、ヒトβ<sub>2</sub>ADNA、ヒトβ<sub>2</sub>ADNAラ イブラリー、ヒト組織・細胞由来のcDNA、ヒト組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用する場合DNAはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、組織・細胞よりmRNA断片を調製したのを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する。)によって増殖することもできる。より

具体的には、配列番号：1のAミノ酸配列を含有するヒト細胞由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとして、配列番号：3で表わされる塩基配列を含有するDNA、配列番号：2のAミノ酸配列を含有するヒト肺由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとして、配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。さらに、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとして、本発明の配列番号：1あるいは配列番号：2のAミノ酸配列と同一または実質的に同一のAミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を含有するDNAをプライマーあるいはプローブとして用いてクロニングされたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAでよいことと理解されよう。さらに具体的に本発明の配列番号：3あるいは配列番号：4のDNA自体あるいはその部分配列またはその情報に基づいたDNAをプライマーあるいはプローブとして用いてクロニングされたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAであってよいことも理解されよう。

【0023】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を完全にコードするDNAのクロニングの手段としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増殖するか、または適当なベクターに組み込んだDNAをヒトG蛋白質共役型レセプター蛋白質の一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて増殖したものとハイブリダイゼーションによって選別する。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば Molec ular Cloning 2nd (ed. : J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行われる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行う。このPCR増殖方法は、公知のPCR法に従って実施することができ。例えば、Saiki R. K. et al. Science 239:487-491(1988)に記載の方法に従って実施することができる。PCR法の温度、時間、バッファー、サイクル数、DNAポリメラーゼなどの酵素、2'-deoxy-7-deaza -guanosine triphosphate やinosineの添加などは対象DNAの種類などに応じて適宜選択することができる。またRNAを鋳型として用いる場合は、Saiki R. K. et al. Science 239:487-491(1988)に記載の方法などに従って行なう。クロン化されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に制限酵素コドンとしてのAATCGを有し、またまたはTACを有している。これらの制限酵素コ

ドンや細胞終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な制限ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13など)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194など)、酵母由来のプラスミド(例、pSH19、pSH15など)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

【0024】形質転換する際の宿主がエシェリヒア属である場合は、trp プロモーター、lac プロモーター、rec Aプロモーター、λPLIプロモーター、lpp プロモーターなど、宿主がバチルス属である場合は、SP OI1プロモーター、SPO2プロモーター、pen Pプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が動物細胞である場合は、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロポネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRαプロモーターなどがそれぞれ利用できる。なお、発現にエンハンサーの利用も効果的である。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属である場合は、アルカリフォスファターゼ・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイテングファクタ-α・シグナル配列、インペルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、α-インテグロフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。

【0025】宿主としては、たとえばエシェリヒア属、バチルス属、酵母、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属、バチルス属の具体例としては、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli) K12、DH1 (プロジェンジン・グロ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユース

ユー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、60巻、160(1968)、J.M.I.3 (ヌクレック・アシックス・リサーチ、(Nucleic Acids Research)、9巻、309(1981)、J.A.221 (ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)、120巻、517(1978)、H.B.101 (ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー、459(1969)、C.600 (ジェネティクス (Genetics)、39巻、440(1954))などが用いられる。バチルス属としては、たとえばバチルス・サチルス(Bacillus subtilis) M114 (ジョン・24巻、255(1983)、207-21 (ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry)、95巻、87(1984))などが用いられる。

【0026】酵母としては、たとえばサッカロマイセスセレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) AH22、AH22R、NA87-11A、DKD-5D、20B-12などが用いられる。昆虫としては、例えばカイロの幼虫などが用いられる(前田、ネイチャー (Nature)、315巻、592(1985))。動物細胞としては、たとえばサル細胞CHO、DHR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (dhfr CHO細胞)、マウスL細胞、マウスミエローム細胞、ヒトFL細胞などが用いられる。エシェリヒア属を形質転換するには、たとえばプロジェンジン・グロ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、69巻、2110(1972)やジョン(Gene)、17巻、107(1982)などに記載の方法に従って行なわれる。バチルス属を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス(Molecular & General Genetics)、168巻、111(1979)などに記載の方法に従って行われる。酵母を形質転換するには、たとえばプロジェンジン・グロ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、75巻、1929(1978)に記載の方法に従って行なわれる。

【0027】昆虫細胞を形質転換するには、たとえばバイオテクノロジー(BioTechnology)、6、47-55(1988)などに記載の方法に従って行なわれる。動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー(Virology)、52巻、456(1973)に記載の方法に従って行なわれる。このようにして、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。宿主がエシェリヒア属、バチルス属である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であ





該細胞または該膜面分に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法。

④標識した試験化合物などを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接合させた場合における、標識した試験化合物などのG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法。

【0035】⑤試験化合物などを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接合させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸遊離、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性）を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、および

⑥試験化合物などを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接合させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸遊離、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性）を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

【0036】本発明のリガンド決定方法の具体的な説明を以下にする。まず、リガンド決定方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものであれば何れのもであってよいが、動物細胞を用いて大量発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質が適している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制限されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス(nuclea

r polyhedrosis virus: NPV)のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRαプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査は、それ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献(Kambh, P. S., ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 267巻, 19555～19559頁, 1992年)に記載の方法に従って行うことができる。

【0037】したがって、本発明のリガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドであってもよいし、G蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、またG蛋白質を含有する細胞の膜面分を用いてもよい。本発明のリガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタリルピドド、ホルリンなどで固定してもよい。固定化方法として、それ自体公知の方法又はそれと類似の方法に従って行うことができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した宿主細胞を用いるが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。膜面分としては、細胞を破壊した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる面分のことをいう。細胞の破壊方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンドーやポリトロン(Kinematic社製)による破壊、超音波による破壊、フレンチプレスなどに加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破壊などが挙げられる。細胞膜の面分には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破壊液を低速(500rpm～3000rpm)で短時間(通常、約1分～10分)遠心し、上清をさらに高速(15000rpm～30000rpm)で通常30分～2時間遠心し、得られる沈液を膜面分とする。該膜面分中には、発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

【0038】該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞や膜面分中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり10<sup>3</sup>～10<sup>4</sup>分子であるのが好ましく、10<sup>5</sup>～10<sup>7</sup>分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜面分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料

を測定できるようにする。G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する前記の①～⑥の方法を実施するためには、適当なG蛋白質共役型レセプター面分と、標識した試験化合物が必要である。G蛋白質共役型レセプター面分としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター面分が、またはそれと同等の活性を有する組換え型G蛋白質共役型レセプター面分が望ましい。

ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性を示す。標識した試験化合物としては、<sup>3</sup>H)、<sup>125</sup>I)、<sup>14</sup>C)、<sup>35</sup>S)などで標識したアンギオテンジン、モンベシン、ボンベシン、カナベノイド、コレシキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オセオイド、ブリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP(バソアクティブインテストイナル)アンドリレイテッドペプチド)、ソマスタチン、GRRP(カルシトニンニンジーンレタードペプチド)、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、バンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボサン、アデノシン、アドレナリン、αおよびβ-cheekone(11-8、GROβ、GROβ、GROγ、NA P-2、ENA-78、PFA、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1α、MIP-1β、RANTESなど)、エンドレリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、バンクレチクテチクポリペプチド、ガラニン、具体的には、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドの決定方法を行うには、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜面分を、決定方法に適したバッファに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファには、pH4～10(望ましくはpH6～8)のリン酸バッファ、トリス-塩酸バッファなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファであればよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>(花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSE、ロイペプチン、E-64(ペプタド研究所製)、ベプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～1.0mlの該レセプター溶液に、一定量(5000cpm～500000cpm)の<sup>3</sup>H)、<sup>125</sup>I)、<sup>14</sup>C)、<sup>35</sup>S)などで標識した試験化合物などを添加させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識の試験化合物を多量に加えた反応チューブも用いる。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、

望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に吸着する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはγ-カウンターで計測する。全結合(B)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B-NSB)が0cpmを超え、該試験化合物などを本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドとして選択することができる。

【0040】G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する前記の①～⑥の方法を実施するためには、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸遊離、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性）を公知の方法または市販の測定キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては、前もって新鮮な培養地盤あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって決定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォスホリノールなど細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制剤を用いて検出することができる。

【0041】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンド決定用キットは、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、あるいは本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜面分を含有するものである。本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. リガンド決定用試験液

①測定用試験液および洗浄用試験液

Blank's Balanced Salt Solution (ギブコ社製)に、0.05%のウシ血清アルブミン(シグマ社製)を加えたもの、孔径0.45μmのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製してもよい。

②G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5×10<sup>5</sup>個/穴で播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 95%airで2日間培養したものを、

















【0084】PCR産物のアラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入cDNA部分の塩基配列の解析による新規レセプター蛋白質候補クローンの選択

実施例2で行なったPCR後の反応産物は、2%のエ

チトロエリエンジョングアロースガルを用いて分離し、バンドの部分をかみ取り切り出した後、熱融解、フェノール抽出、エタノール沈殿を行ってDNAを回収した。TAクローニングキット（インビトロゲン社）の如方に従い、回収したDNAをアラスミドベクター-pCR<sup>II</sup>（TMは登録商標を意味する）へサブクローニングした。これら大腸菌JM109 competent cell（宝酒薬株式会社）に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアプデシリン、インゾルチオ-β-D-ガラクトシド（IPTG）および5-ブ

シド（X-gal）を含むLB寒天培地（Muria-Bertan 1 agar medium）中で選択し、白色を呈するクローンのみを減菌したつま細枝を用いて分離し、形質転換体エシエリヒ7 コリ（Escherichia coli）JM109/pPB

BS002を得た。個々のクローンをアプデシリンを含むLB培地で一般培養し、自動アラスミド抽出装置（クボテック社）を用いてアラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてECORIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。現りのDNAの一部をさらにRNase処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応は、Dyebeary Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライド・バイオシステムズ社：AB1社）を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、得られた塩基配列の解析はDNASIS（日立システムエンジニアリング社）を用いて行った。図1において下線で示した部分はPCRで用

いた合成プライマーに相当する部分である。決定した塩基配列（配列番号：3（図1の塩基配列））をもちにホモロジー検索を行なった結果、形質転換体エシエリヒ7 コリ（Escherichia coli）JM109/pPBBS0

02の保有するアラスミドに挿入されたcDNA断片が新規cDNA蛋白質型レセプター蛋白質をコードすることとが分かった。それをさらに確認するために、DNASIS（日立システムエンジニアリング社）を用い、塩基配列をアミノ酸配列に変換した（配列番号：1（図1のミノ酸配列））。疎水性プロット（図2）およびノットスタチンセクター・サブタイプ1（P30872）、ヒトノットスタチンセクター・サブタイプ2（P30874）およびヒトのノットスタチンセクター・サブタイプ3（P32745）との相関性を見いだした（図3）。上記の（ ）内の略号は、NCBI-PIR/Swiss-Prot にデータとして登録される際の略号であり、通常

Accession Numberまたはエントリ・ネームと呼ばれるものである。

【0085】ヒト肺由来 poly(A)・RNA画分からのcDNAの合成

ヒト肺由来 poly(A)・RNAは、クローニング社（Clontech Laboratories, USA）から購入した。購入した poly(A)・RNA画分5μgにプライマーとしてラットDNAヘキサマー（BRL社）を加え、モロニイ・ヤス白血病ウイルスの逆転写酵素（BRL社）により、添付プライマーを用いて相補DNAを合成した。反応後の産物はエタノール沈殿を行った後、30μlのTE（Tris-EDTA solution: 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)）に溶解した。

【0086】

【実施例5】ヒト肺由来cDNAを用いたPCR法による受容体cDNAの増幅

実施例4でヒト肺由来より調製したcDNA3μlを鋳型として使用し、上記参考例で合成したT2A、T7AのDNAプライマーを用いてPCR法による増幅を行った。反応液の組成は、核合成DNAプライマー各100pM、0.25mM dNTPs（deoxyribonucleoside triphosphates）、Taq DNA polymerase（宝酒薬株式会社）、1μlおよび酵素に付面の10×Taq buffer（10μlで、総反応液量は100μlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキン・エルマー社）を用い、96℃・30秒、45℃・1分、60℃・3分のサイクルを25回繰り返した。Taq DNA polymerase を添加する前に、現りの反応液を混合し、95℃・5分、65℃・5分の加熱を行った。増幅産物の濃度は1.2%アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。

【0087】

【実施例6】PCR産物のアラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入cDNA部分の塩基配列の解析による新規レセプター蛋白質候補クローンの選択

実施例5で行なったPCR後の反応産物は、2%のエチトロエリエンジョングアロースガルを用いて分離し、バンドの部分をかみ取り切り出した後、熱融解、フェノール抽出、エタノール沈殿を行ってDNAを回収した。TAクローニングキット（インビトロゲン社）の如方に従い、回収したDNAをアラスミドベクター-pCR<sup>II</sup>（TMは登録商標を意味する）へサブクローニングした。これら大腸菌JM109 competent cell（宝酒薬株式会社）に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアプデシリン、インゾルチオ-β-D-ガラクトシド（IPTG）および5-ブ

シド（X-gal）を含むLB寒天培地（Muria-Bertan 1 agar medium）中で選択し、白色を呈するクローンのみを減菌したつま細枝を用いて分離し、形質転換体エシエリヒ7 コリ（Escherichia coli）JM109/pPLBS00303を得た。個々のクローンをアプデシリンを含むLB培地で一般培養し、自動アラスミド抽出装置（クボテック社）を用いてアラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてECORIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。現りのDNAの一部をさらにRNase処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応は、Dyebeary Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライド・バイオシステムズ社：AB1社）を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、得られた塩基配列の解析はDNASIS（日立システムエンジニアリング社）を用いて行った。図4において下線で示した部分はPCRで用

いた合成プライマーに相当する部分である。決定した塩基配列（配列番号：4（図4の塩基配列））をもちにホモロジー検索を行なった結果、形質転換体エシエリヒ7 コリ（Escherichia coli）JM109/pPLBS00303の保有するアラスミドに挿入されたcDNA断片が新規cDNA蛋白質型レセプター蛋白質をコードすることが分かった。それをさらに確認するために、DNASIS（日立システムエンジニアリング社）を用い、塩基配列をアミノ酸配列に変換した（配列番号：2（図4のミノ酸配列））。疎水性プロット（図5）およびアミノ酸配列に基づくホモロジー検索を行ない、ヒトのノットスタチンセクター・サブタイプ2（P30874）、

ヒトのノットスタチンセクター・サブタイプ3（P32745）およびヒトのノットスタチンセクター・サブタイプ1（P30872）との相関性を見いだした（図6）。上記の（ ）内の略号は、NCBI-PIR/Swiss-Prot にデータとして登録される際の略号であり、通常Accession Numberまたはエントリ・ネームと呼ばれるものである。

【0088】

【発明の効果】本発明のcDNA蛋白質型レセプター蛋白質および該蛋白質をコードするDNAは、①本発明の蛋白質候補型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定、②抗体および抗血清の入手、③相対型レセプター蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較をもつたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子移転におけるプロモーター、PCRプライマーの作成、⑦遺伝子治療等に用いることができる。特に、cDNA蛋白質型レセプター-核酸・性質の解明はこれらの系に作用するユニークな医薬品の開発につながる。

【0089】

【配列表】

【配列番号：1】  
配列の長さ：223  
配列の型：アミノ酸  
1ボロジーン：直鎖状  
配列の種類：ベクター

Ala Ile Ala Asp Glu Leu Phe Thr Leu Val Leu Pro Ile Asn Ile Ala  
1 5 10 15  
Asp Phe Leu Leu Arg Gln Trp Pro Phe Gly Gln Leu Met Cys Lys Leu  
20 25 30  
Ile Val Ala Ile Asp Gln Tyr Asn Thr Phe Ser Ser Leu Tyr Phe Leu  
35 40 45  
Thr Val Met Ser Ala Asp Arg Tyr Leu Val Val Leu Ala Thr Ala Glu  
50 55 60  
Ser Arg Arg Val Val Gly Arg Thr Tyr Ser Ala Ala Arg Ala Val Ser  
65 70 75 80  
Leu Ala Val Trp Gly Ile Val Thr Leu Val Val Leu Ser Phe Ala Val  
85 90 95  
Phe Ala Arg Leu Asp Asp Gln Gln Gly Arg Arg Gln Cys Val Leu Val  
100 105 110  
Phe Pro Gln Pro Gln Ala Phe Trp Trp Arg Ala Ser Arg Leu Tyr Thr  
115 120 125  
Leu Val Leu Gly Phe Ala Ile Pro Val Ser Thr Ile Cys Val Leu Tyr  
130 135 140  
Thr Thr Leu Leu Cys Arg Leu His Ala Met Gly Leu Asp Ser His Ala  
145 150 155 160  
Lys Ala Leu Glu Arg Ala Lys Lys Arg Val Thr Phe Leu Val Val Ala  
165 170 175

Ile Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Trp Thr Pro Tyr His Leu Ser Thr  
180 185 190  
Val Val Ala Leu Thr Thr Asp Leu Pro Cln Thr Pro Leu Val Ile Ala  
195 200 205  
Ile Ser Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ser Tyr Ala Asn Ser Cys Leu  
210 215 220 223  
【0090】  
【配列番号：2】  
配列の長さ：224  
配列の種類：ペプチド

Ala Val Ala Asp Cln Leu Phe Thr Leu Val Val Leu Pro Val Asn Ile Ala  
1 5 10 15  
Cln His Leu Leu Cln Tyr Trp Phe Cln Leu Leu Cys Lys Leu  
20 25 30  
Val Leu Ala Val Asp His Tyr Asn Ile Phe Ser Ser Ile Tyr Phe Leu  
35 40 45  
Ala Val Met Ser Val Asp Arg Tyr Leu Val Val Leu Ala Thr Val Arg  
50 55 60  
Ser Arg His Met Pro Trp Arg Thr Tyr Arg Cln Ala Lys Val Ala Ser  
65 70 75 80  
Leu Cys Val Trp Leu Cln Val Thr Val Leu Val Leu Pro Phe Ser  
85 90 95  
Phe Ala Cln Val Tyr Ser Asn Cln Leu Cln Val Pro Ser Cys Cln Leu  
100 105 110  
Ser Phe Pro Trp Cln Cln Val Trp Phe Lys Ala Ser Arg Val Tyr  
115 120 125  
Thr Leu Val Leu Cln Phe Val Leu Pro Val Cys Thr Ile Cys Val Leu  
130 135 140  
Tyr Thr Asp Leu Leu Arg Leu Arg Ala Val Leu Arg Ser Cln  
145 150 155 160  
Ala Lys Val Leu Cln Lys Ala Arg Arg Lys Val Thr Val Leu Val Leu  
165 170 175  
Val Val Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Trp Thr Phe His Leu Ala  
180 185 190  
Ser Val Val Ala Thr Thr Asp Leu Pro Cln Thr Pro Leu Val Ile  
195 200 205  
Ser Met Ser Tyr Val Ile Thr Ser Leu Ser Tyr Ala Asn Ser Cys Leu  
210 215 220 224  
【0091】  
【配列番号：3】  
配列の長さ：669  
配列の種類：核酸

CCCCTCCGCC ACCAGCTCTT CACCTCTGTC CTGCGCATCA ACATCCGCCA CTTCCTCTTC 60  
CGCCACTGCG CCTTCCGCCA CTTCTCTCTC AGCTCTCTCC TCGCTATCCA CCACCTACAC 120  
ACCTCTCTCA GTCTCTACTT CTTACAGCTC ATCAGCGCGC ACCCTACTCT CTTCTCTCTC 180  
CCCACTCGCC AGTCGCCGCC GGTCTCTGCT CTTACTCTCA CTGCGCGCGC CCGCTGTACG 240  
CTGCGCTCTT GCGGCGATCT CACACTCTCT CTGCTCTCTT TCGCAGTTCT CCGCCGCTTA 300  
CAGCAGACGC AGCGCGCGCC CAGCTCTCTC CTAGCTCTTC CCACGCCCA GCGCTCTCTC 360  
TCCCGGCCCA CGCCCTCTTA CACCTCTCTC CTGCGCTTCC CACTCCCTCT CTCTACATC 420

TTCTCTCTCT ATACACCTCT CTTCTCTCGC CTGCTATCCA TCGCGCTCCA CAGCCAGCCC 480  
AMGCGCTGCG ACCCGGCCAA CAGCGCGCTC AGCTCTCTCC TCGTCCCAT CTCTCGCTTC 540  
TCTCTCTCT CTCTACAGCC CTACAGCTCC TCGCGCTTAC CAGCGAGCTC 600  
CGCAGAGCC CCGCTCTCAT CCTATCTCC TACTCTATCA CAGCGCTAC CTACGCCAC 660  
AGCTCTCTC 669

【0092】  
【配列番号：4】  
配列の長さ：672  
配列の種類：核酸

CCCCTCCGCC ACCAGCTCTT CACCTCTCTA CTGCGCATCA ACATCCGCCA CCACCTCTTC 60  
CAGTACTGCG CCTTCCGCCA CTTCTCTCTC AGCTCTCTCC TCGCGCTCCA CCACCTACAC 120  
ATCTCTCCA CCACTACTCT CTTAGCGCTC ATCAGCGTCC ACCCTACTCT CTTCTCTCTC 180  
CGCAGCTCA CTTCTCGCCA CATGCGCTCC CCACTTAC CCGCGGCCAA CTTCTCCAGC 240  
CTCTCTCTCT CCGTCTGCTT CACCTCTCTC CTTCTCTCTT TCTCTCTCTT CCGTCTGCTC 300  
TACAGCAGC AGCTCTGCTT CCACTCTCTT TCGCGCTCTC TCGCGCTTCC CAGCGAGCTC 360  
TCTCTCAGC CCGAGCGCTT CTACAGCTTC GTCTCTGCTC CCGTCTCTCC CTTCTCTCAC 420  
ATCTCTCTCC TCTTACAGCA CTTCTCTGCC AGCTCTCGCC CCGTCTGCTC CCGCTCTCCA 480  
CCAGAGCTTC TACCGAGGCC CTTACAGCTCC TCTCTCTCTT CTTCTCTGCC 540  
CTCTCTCTCC TCTCTCTGAC CCGCTCTGAC CTGCGCTCTC TCGTCTGCTT CAGCAGCGAC 600  
CTTCCGCCCA CCGCCTCTCT TCTTACTATC TCTTACTATC TCGCTCTGCC CAGCTCTGCC 660  
AMCTCTGCC TC 672

【0093】  
【配列番号：5】  
配列の長さ：27  
配列の種類：核酸

【0094】  
【配列番号：6】  
配列の長さ：27  
配列の種類：核酸

【0095】  
【配列番号：7】  
配列の長さ：27  
配列の種類：核酸

【0096】  
【配列番号：8】  
配列の長さ：27  
配列の種類：核酸

【0097】  
【配列番号：9】  
配列の長さ：27  
配列の種類：核酸

【0098】  
【配列番号：10】  
配列の長さ：27  
配列の種類：核酸

【0099】  
【配列番号：11】  
配列の長さ：27  
配列の種類：核酸

【0100】  
【配列番号：12】  
配列の長さ：27  
配列の種類：核酸

【0101】  
【配列番号：13】  
配列の長さ：27  
配列の種類：核酸

【0102】  
【配列番号：14】  
配列の長さ：27  
配列の種類：核酸

【0103】  
【配列番号：15】  
配列の長さ：27  
配列の種類：核酸

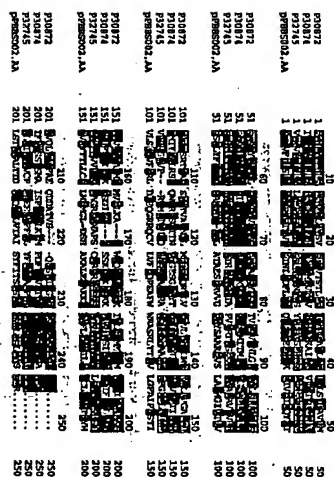
【0104】  
【配列番号：16】  
配列の長さ：27  
配列の種類：核酸

【0105】  
【配列番号：17】  
配列の長さ：27  
配列の種類：核酸

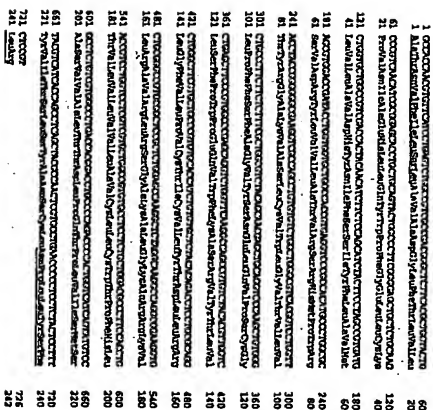
【図1】



【図3】

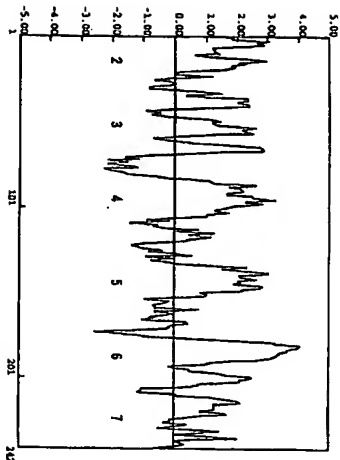


【図4】

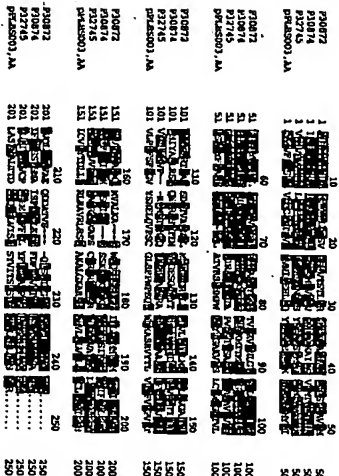




【図5】



【図6】



フロッピーディスクの書き

(31) Inc. Cl. 6

COIN 33/566

// A61K 38/00

39/395

48/00

C12Q 1/68

(C12N 1/21

C12R 1:19)

識別記号

斤内整理番号

F I

COIN 33/566

A61K 39/395

D

N

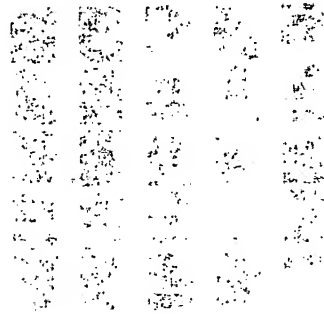
A

技術表示箇所

(72)発明者 藤井 亮

茨城県つくば市落口1丁目7番地の9 武  
田春日ハイッ303号

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**